**НАУКОВО-МЕТОДОЛОГІЧНИЙ ПІДХІД ДО СТАНДАРТИЗАЦІЇ
ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ І ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИННИХ
ЗАСОБІВ ЗІ ЗАСТОСУВАННЯМ МЕТОДУ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ
ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ****Ключові слова:** високоефективна тонкошарова хроматографія, лікарська рослинна сировина, ідентифікація, кількісне визначення, домішки, стандартизаціяК. О. KHOHLLOVA (<http://orcid.org/0000-0002-7151-6763>)*National University of Pharmacy, Kharkiv***SCIENTIFIC-METHODOLOGICAL APPROACH FOR STANDARDIZATION OF
HERBAL RAW MATERIALS AND HERBAL PREPARATIONS USING HIGH-
PERFORMANCE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY PROCEDURE****Key words:** high-performance thin-layer chromatography; herbal raw material; identification; quantification; adulterations; standardization

Для виявлення і попередження фальсифікації лікарської рослинної сировини (ЛРС) і лікарських рослинних засобів (ЛРЗ) широке застосування знаходить метод високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) [1–6]. Метод є інструментальним, відтворюваним і дає змогу здійснювати документування результатів аналізу у вигляді знімків хроматограм, профілей піків, одержаних із хроматограми чи денситограми, порівнювати результати різних дослідів [1], що зумовлює його використання не тільки для ідентифікації і визначення домішок, а й для проведення напівкількісного і кількісного визначення, досліджень стабільності, виконання біоавтографічних тестів, оцінки і моніторингу культивування, вирощування, екстракційного процесу тощо [2–6].

Із введенням загальної статті Державної фармакопеї України (ДФУ) 2.8.25 «Високоефективна тонкошарова хроматографія лікарської рослинної сировини та лікарських рослинних засобів» [7] відкрився актуальний напрям по оптимізації існуючих фармакопейних методик тонкошарової хроматографії і розробленню нових методик ВЕТШХ для ідентифікації ЛРС і визначення сторонніх домішок, а також по розробленню альтернативних методик визначення кількісного вмісту методом ВЕТШХ та інших тестів.

Метою цієї роботи є визначення проблемних питань контролю якості ЛРС в Україні та розроблення системного науково-методологічного підходу до стандартизації ЛРС і ЛРЗ зі застосуванням сучасного аналітичного методу ВЕТШХ, зокрема до оптимізації існуючих і розробки нових методик ідентифікації і визначення домішок ЛРС і ЛРЗ, і розробки альтернативних методик кількісного визначення, досліджень стабільності.

Матеріали та методи дослідження

Довідники рослин флори України [8–10]. Монографії на ЛРС і ЛРЗ фармакопей світу, компендіуми і міжнародні реферативні бази хроматографічних відбитків [11–14]. Аналіз, порівняння, синтез.

Результати дослідження та обговорення*Підходи до стандартизації ЛРС у ДФУ та інших компендіумах*

Застосовувана ЛРС (вид рослини, частина, стан) і підходи до стандартизації ЛРС (біологічно активні речовини (БАР), що визначають; комбінації фізико-хімічних методів; методики) різняться для різних фармакопей світу [11–16], на що впливає як

фармакопейна концепція щодо розробки монографій, так і економічний розвиток країни, рівень оснащення лабораторій, вартість проведення аналізу, національні особливості вирощування, заготівлі і стандартизації ЛРС тощо.

Документом, що регламентує якість ЛРС в Україні є ДФУ. Вітчизняна фармакопея гармонізована з Європейською фармакопеею (ЄФ), містить низку монографій на ЛРС, що є адаптованим перекладом монографій ЄФ і які, за потреби, містять національну частину (зі змінами у критеріях прийнятності, методиках, стандартних зразках), та окремі національні монографії (наприклад, на види ЛРС, описані в ДФ 11 і не описані в ЄФ, або відповідні ЛРЗ). Однак, лишаються численні види рослин флори України, що не включено у вітчизняну фармакопею ні як національні монографії на ЛРС, ані введено до національної частини монографії до вже існуючої монографії близького виду, ані включено до випробувань «Сторонні домішки» до вже існуючої монографії близького виду, а одже ці види ніяк не контролюють, при цьому можуть помилково заготовляти як ЛРС (фальсифікат). Наприклад, в ДФУ включено монографії лише на *Thymus vulgaris* і *T. serpyllum*, а поширені в Україні *T. marshallianus*, *T. pallasianus*, *T. calcareus* не стандартизовано. Незважаючи на це, згідно з довідниками для збору і заготівлі ЛРС, *T. marshallianus* може використовуватися для масової заготівлі чебрецю в Україні [10].

Для контролю якості ЛРС у ДФУ використовують гармонізовані з ЄФ підходи до стандартизації [17]. Так, у монографіях на ЛРС ДФУ/ЄФ найчастіше для ідентифікації і виявлення домішок використовують макро- і мікроскопію, тонкошарову хроматографію (ТШХ)/ВЕТШХ, рідше інші хроматографічні техніки (наприклад газову хроматографію (ГХ) для визначення домішок до ефірних олій) та для кількісного визначення специфічних компонентів методи – високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), ГХ, спектрофотометрії в УФ і видимій області [2], методи фармакогнозії для визначення певних класів БАР – визначення танінів, визначення ефірних олій; об'ємне титрування тощо.

Метод ТШХ/ВЕТШХ для ідентифікації і визначення домішок ЛРС і ЛРЗ у різних фармакопеях і компендіумах світу

Для проведення ідентифікації у ДФУ і ЄФ та інших фармакопеях світу [17, 18] традиційно застосовують методи макро- і мікроскопії, ТШХ/ВЕТШХ. Найважливішим для ідентифікації ЛРС вважають метод ТШХ/ВЕТШХ, оскільки різні рослини і їх екстракти мають унікальні хроматографічні профілі. Проведення макроскопії часто може бути унеможливлено ступенем подрібнення сировини (коли для точної аутентифікації навіть досвідчений ботанік потребує мати цілу рослину/гербарний зразок, а мікроскопічні діагностичні ознаки можуть бути подібними для багатьох видів. При цьому, макро- і мікроскопія є неможливими для ЛФ ЛРЗ (екстракт, настойка тощо) [2]. Метод ТШХ/ВЕТШХ є зручним і простим для інтерпретації результатів порівняно з ВЕРХ і ГХ.

На сьогодні переважна кількість монографій на ЛРС ДФУ містить одну, рідше дві методики ідентифікації методом ТШХ, які виконують згідно зі загальною статтею 2.2.27 «Тонкошарова хроматографія». Зазвичай ідентифікацію здійснюють за визначенням хроматографічних відбитків однієї групи речовин (аналітичні маркери чи активні речовини), рідше – двох груп БАР, для чого застосовують переважним чином уніфіковані рухомі фази. Наприклад, рухомі фази на флавоноїди і фенілкарбонові кислоти, на ефірні олії, на глікозидовані терпеноїдні сполуки, гідроксиантраценові похідні та ін. [18]. Згідно з ДФУ, методика ідентифікації ТШХ включає опис підготовки проби, хроматографічні умови і критерії прийнятності, які наведено у вигляді референс-таблиці з характеристичним розміщенням зон для зразка/зразків порівняння і випробовуваного розчину. При цьому, низка методик ідентифікації ЛРС

за методом ТШХ може бути виконана не лише на ТШХ пластинах (товщина шару 5–40 мкм), а й зі застосуванням ТШХ пластин із шаром силікагелю 2–10 мкм, що відповідає характеристиці ВЕТШХ пластин; для чого у дужках наведено відповідні зміни в умовах хроматографування – зменшена відстань для хроматографування і об’єм для нанесення зразків, що зумовлено меншим розміром частинок ВЕТШХ пластин і дає змогу отримувати краще розділення речовин на коротшій дистанції пробігу речовин, застосовуючи менші кількості розчинів для нанесення.

Незважаючи на те, що фармакопейні методики вважають валідованими і надійними, більшість із методик ТШХ потребують критичної оцінки (теоретичної і практичної (верифікації/апробації)) і подальшої оптимізації [19] чи розробки нових методик ВЕТШХ відповідно до загального розділу 2.8.25, де наведено стандартизовану процедуру проведення ідентифікації ВЕТШХ; а також відповідно до вимог, що висувають до сучасних аналітичних методик. Так, існуючі методики ТШХ ЛРС мають низку недоліків, що зумовлені застосовуваною стаціонарною фазою і ручним проведенням аналізу: недостатнє розділення речовин, невідтворюваність аналізу, неможливість одночасного отримання інформації щодо кількісного вмісту компонентів, неможливість точного документування і зберігання результатів аналізу відповідності до GLP. Однак, невідтворюваність аналізу може бути зумовлена також і недоліками застосовуваної методики. Так, часто у монографіях на близькі види однієї родини для ідентифікації використовують різні класи БАР/маркери і, як наслідок, аналіз здійснюють у різних рухомих фазах (наприклад, *T. vulgaris* ідентифікується ТШХ за флавоноїдним профілем, а *T. serpyllum* – за профілем ефірних олій), що унеможливорює виявлення небажаної домішки близьким видом, оскільки відсутні дані щодо хроматографічних профілей близьких рослин в одних умовах. Інший приклад, монографії на ЛРС м’яти і меліси, і відповідні сухі екстракти, де для ідентифікації ТШХ листя м’яти і меліси передбачено визначення ефірних олій, а для сухих екстрактів м’яти і меліси пропонують ідентифікацію флавоноїдів і гідроксикоричних кислот, що суперечить підходам «скрізної» стандартизації (єдині підходи до стандартизації як сировини, так і препаратів із неї).

Окремим і важливим питанням є проведення верифікації методик ТШХ і розробки методик ВЕТШХ зі застосуванням вітчизняних зразків ЛРС (різні регіони України), оскільки один і той самий вид рослини, що вирощувався в різних клімато-географічних умовах, може мати відмінні хроматографічні відбитки, а отже критерії прийнятності, що були встановлені ЄФ, можуть бути не придатними для контролю якості рослин флори України. Крім того, під час розроблення і верифікації методик ВЕТШХ мають бути визначені і протестовані у тих самих умовах споріднені види рослин, які можуть заготовлятися в Україні як ЛРС. Визначення хроматографічних відбитків ВЕТШХ споріднених видів, поширених в Україні, може бути використано для включення виду у ту саму монографію (за умови близького хімічного складу досліджуваних видів) або для випробування «Домішки», чи для розроблення нової монографії на ЛРС (якщо вид має відмінні хроматографічні відбитки) після проведення інших випробувань і фармакологічних досліджень.

Згідно зі загальною статтею 2.8.25 «Високоєфективна тонкошарова хроматографія лікарської рослинної сировини та лікарських рослинних засобів» ДФУ, для придатності хроматографічної системи використовують «критичну пару» речовин, що мають близьке хроматографічне розділення у запропонованій рухомій фазі. Це можуть бути як речовини, що містяться у СЗ фармакопейного екстракту, так і окремі речовини [2, 11, 12]. Для критеріїв прийнятності для методики ідентифікації ВЕТШХ зберігається формат «референс-таблиці» зі схематичним зображенням розміщення зон випробовуваного розчину і розчину порівняння. Для зон зазначається колір і їх інтенсивність: інтенсивна, менш інтенсивна, слабка. При цьому для порівняння ін-

тенсивності зон випробовуваного розчину застосовують два розчини порівняння: розчин порівняння (1) і його чотирикратне розведення – розчин порівняння (2). Хроматограми випробовуваних зразків, одержаних під час розроблення методики ідентифікації ВЕТШХ, у ДФУ і ЄФ не наводять. Однак, у ЄФ вони наводяться у «Базі знань», що доступна онлайн-зареєстрованим користувачам; USP НМС і Міжнародна асоціація ВЕТШХ, які є онлайн-компендіумами зі стандартизації рослин, надають онлайн доступ до хроматограм ВЕТШХ різної ЛРС [13, 14].

Підходи до кількісного визначення ЛРС і ЛРЗ

Застосовувані методи кількісного визначення ЛРС і ЛРЗ, такі як, наприклад, спектрофотометрія і визначення ефірних олій методом дистиляції з водяним паром, є доступними і простими, але вважаються не специфічними. Метод визначення ефірних олій застосовують переважно для ЛРС і не придатний для застосування в ЛРЗ, потребує великої кількості сировини для аналізу, є довготривалим, особливо у разі виконання тестування великої кількості зразків. Метод спектрофотометрії є сумарним, інформація щодо складу і кількісного вкладу різних речовин досліджуваного зразка відсутня. Спектрофотометричні методики розраховані на аналіз лише одного випробовуваного зразка, а аналіз різних серій потребує повторного проведення повного циклу аналізу, що зумовлює тривалість аналізу, додаткові витрати необхідних реагентів і розчинників для аналізу. Методи можуть використовуватися лише для сумарного кількісного вмісту і потребують проведення ідентифікації зразка додатковими методами. На сьогодні, методом вибору для кількісного визначення є специфічний метод ВЕРХ, який, однак, використовує принцип послідовного аналізу зразків у колонці, отже виникає ризик крос-контамінації зразків; окрім того, при необхідності дослідження великої кількості серій зразків ЛРС метод є не дуже зручним. До того ж, аналізують лише ті компоненти, що вийшли з колонки. Існуючі підходи до специфічного кількісного аналізу передбачують визначення лише 0,02–5% маркерів від загального вмісту БАР ЛРС. Такий підхід, з огляду на фармакологічну дію ЛРС, зумовлену сумою речовин, також може бути поставлений під питання [2]. А, отже, для кількісного визначення ЛРС і ЛРЗ можуть бути запропоновані альтернативні методики ВЕТШХ, що можна використовувати для визначення як специфічних маркерів, так і суми речовин після розділення.

Метод ВЕТШХ для кількісного визначення ЛРС і ЛРЗ

У ДФУ/ЄФ ТШХ і ВЕТШХ традиційно використовують для ідентифікації ЛРС, визначення домішок і виявлення фальсифікації шляхом візуальної оцінки результатів. Візуальне порівняння розмірів й інтенсивності зон випробовуваного розчину і розчину порівняння може надати й приблизну оцінку щодо кількості аналіту. Використовують два варіанти візуальної оцінки ТШХ/ВЕТШХ: тест на граничний вміст (дає відповідь чи аналізована речовина міститься у меншій/більшій кількості за встановлений граничний вміст) або напівкількісне визначення (оцінка кількості речовини шляхом порівняння інтенсивності і розміру зони випробовуваного розчину зі зонами розчинів порівняння різної концентрації (не менше 4 калібрувальних точок у діапазоні концентрацій) [5, 20]. Однак, інструментальна ВЕТШХ дає змогу здійснювати й специфічні і відтворювані кількісні вимірювання речовин, що поглинають або флуоресціюють в ультрафіолетовому або видимому світлі, після їх розділення на пластині. При цьому, для детектування і кількісної оцінки компонентів може бути використана система фото-документування (при 254 нм, 366 нм або білому світлі) або різноманітні скануючі денситометри (різні діапазони від 190 до 900 нм) [20, 21]. Перевагою кількісної оцінки методом ВЕТШХ є специфічність, можливість проведення кількісного визначення розділених компонентів електронного знімка хроматограми шляхом трансформації їх у профіль піків (паралельно з ідентифікацією), паралель-

не кількісне визначення багатьох зразків, належне документування, зберігання і оброблення результатів залежно від мети. Наприклад, тест на мінімальний вміст (не менше) чи максимальний вміст (не більше) домішок або кількісне визначення одного компонента чи суми профілів піків усіх речовин, що розділилися за заданих умов; визначення кількісного співвідношення компонентів тощо.

Метод ВЕТШХ для біоавтографічних досліджень ЛРС і ЛРЗ

ТШХ-біоавтографія, що поєднує розділення речовин на пластинці і біокількісне визначення, є методом вибору для прямого скринінгу БАР ЛРС. ТШХ-біоавтографія дає змогу не тільки визначити притаманну активність ЛРС, а й виявити, які саме речовини проявляють цю активність. Біодетектування на пластинці є простим, зручним і не трудомістким способом для попереднього визначення *in vitro*: антимікробної активності, інгібування ацетилхолінестерази (уповільнення прогресування хвороби Альцгеймеру), інгібування α - і β -глюкозидази (лікування діабету), захоплення вільних радикалів і антиоксидантної активності та ін. На сьогодні ТШХ-біоавтографічну методику ідентифікації з 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил радикалами включено у монографію *Rehmanniae Radix* Китайської фармакопеї [16]. Отже, актуальним напрямом стандартизації ЛРС і ЛРЗ в Україні може стати розроблення методик біодетекції ВЕТШХ шляхом оптимізації відповідних методик ідентифікації ТШХ/ВЕТШХ.

Проблемні питання стандартизації ЛРС і ЛРЗ в Україні

Таким чином, критична оцінка існуючих підходів до стандартизації ЛРС в Україні виявила низку *проблемних питань*: обмежену кількість національних монографій на ЛРС флори України, що включені лише до ДФ 11 вид. та відсутність фармакопейної стандартизації лікарських рослин флори України, що не включені ані до ЄФ, ані до ДФ 11 вид.; не врахування у монографії (опис, ідентифікація, випробування на «Домішки») споріднених видів досліджуваного зразка флори України; недостатню специфічність комбінацій застосовуваних фізико-хімічних методів для ідентифікації, випробувань на домішки, кількісного визначення; недостатню специфічність, невідтворюваність, складність і трудомісткість методик, використання токсичних розчинників, прекурсорів; використання різних груп БАР і методик для вихідної сировини і його препарату, або для близьких видів ЛРС (наприклад, видів однієї родини, що мають близький склад); відсутність знімків типових ТШХ/ВЕТШХ хроматограм (референс-знімки) у фармакопеях чи інших онлайн ресурсах; відсутність інформації щодо хроматографічних профілей інших частин досліджуваного виду рослини, впливу розчиннику на хроматографічний профіль, впливу технологічного процесу на хроматографічний профіль (для ЛРЗ); складність і неоднозначність інтерпретації результатів (наприклад, критерії у формі таблиці у методиках ТШХ); невідповідність вітчизняної сировини критеріям прийнятності монографій ДФУ/ЄФ; застосування методів аналізу, які не задовольняють вимогам документування відповідно до GLP; обмеження визначення, що мають застосовуватися методи і методики – потреба у витратах великої кількості розчинників на один аналіз, можливість аналізу лише одного зразка одночасно (ВЕРХ, ГХ, спектрофотометрія, визначення ефірних олій тощо); необхідність використання великої кількості сировини для кількісного визначення (визначення ефірних олій); потреба у проведенні окремих тестів для ідентифікації, випробувань на домішки, кількісного визначення; брак інформації щодо активних маркерів ЛРС і визначення/контроль обмеженої кількості груп БАР/маркерів; специфічне кількісне визначення лише 0,02–5% маркерів від загального вмісту БАР ЛРС чи визначення суми БАР неспецифічними методами; відсутність регламентації строків і умов зберігання ЛРС.

Для вирішення існуючих проблемних питань стандартизації ЛРС і ЛРЗ нами запропоновано системний науково-методологічний підхід до стандартизації вітчизняної рослинної сировини і препаратів за допомогою методу ВЕТШХ, який наведено на рис. 1.

Рис. 1. Методологічна схема оптимізації підходів до стандартизації лікарської рослинної сировини і лікарських рослинних засобів методом вискоєфективної тонкошарової хроматографії

Запропонований підхід включає попередній збір інформації про об'єкт дослідження, аналітичні/активні маркери/групи БАР, підходи до його стандартизації; теоретичну і експериментальну оцінку існуючих методик-контролю якості у монографіях на ЛРС на зразках вітчизняної ЛРС і визначення необхідності їх оптимізації шляхом паралельного розроблення специфічних, відтворюваних і документованих методик ідентифікації, визначення домішок, кількісного визначення і біодетекція

(за потреби) методом ВЕТШХ для видів ЛРС флори України. При цьому, розроблені методики ВЕТШХ також можуть бути застосовані для досліджень стабільності зразків.

1. *Вибір зразка дослідження.* Передбачено проведення збору інформації щодо об'єкту дослідження: вид (лат., укр., англ.) і частина рослини, поширеність використання ЛРС і відповідних ЛРЗ у медичній практиці, попит на продукцію; фармакопейна стандартизація, стан проростання рослини (дика, культивована), можливості заготівлі в Україні, правила заготівлі; близькі види флори України, як фармакопейні, так і не фармакопейні; морфологічно схожа сировина; сировина, що має близький хімічний склад; використання інших частин досліджуваного виду; виявлення випадків фальсифікації у світі і в Україні, характер фальсифікації; препарати на ринку України (лікарська форма (ЛФ), склад, екстрагент, технологія, фармакологічна активність і призначення).

2. *Визначення груп БАР/маркерів досліджуваного виду.* Передбачено визначення хімічного складу ЛРС, основних активних груп БАР/маркерів, що роблять внесок у загальну фармакологічну активність, чи БАР, відповідальних за терапевтичний ефект, виявлення специфічних груп БАР/маркерів рослини.

3. *Визначення і критична оцінка існуючих підходів до стандартизації ЛРС/ЛРЗ, визначення необхідності їх оптимізації.* Передбачено визначення застосовуваних класів БАР/маркерів ЛРС і ЛРЗ та комбінацій фізико-хімічних методів, що застосовують для ідентифікації, визначення домішок, кількісного визначення у ДФУ та інших фармакопєях, компендіумах, наукових публікаціях. Виконання їх критичного оцінювання і апробації на зразках вітчизняної ЛРС (не менше 2-х зразків). Критична оцінка включає теоретичне оцінювання: груп БАР, маркерів, що визначаються; специфічність застосовуваних методів і методик – ідентифікації, визначення домішок, кількісного визначення; відтворюваність методик (оцінка пробопідготовки і всіх етапів методики, стабільність маркерів); відповідність сучасним вимогам до аналітичних методик; гармонізацію застосовуваних підходів для споріднених видів (наприклад, ті самі групи БАР і методики визначення для близьких видів сировини), що необхідно для однозначної ідентифікації ЛРС і попередження фальсифікації. У ході апробації методики паралельно із тестуванням зразків досліджуваної ЛРС доцільно здійснювати і тестування потенційних домішок (інші частини сировини, близькі види флори України та ін.). Мають бути оцінені встановлені критерії прийнятності методик і можливість їх застосування для контролю якості вітчизняної ЛРС. За результатами теоретичної і практичної оцінки має бути зроблений висновок про необхідність і можливість оптимізації існуючих методик із використанням методу ВЕТШХ.

4. *Оптимізація існуючих підходів стандартизації ЛРС і ЛРЗ методом ВЕТШХ.* Оптимізацію методик ТШХ у ВЕТШХ чи розроблення нових методик ідентифікації ВЕТШХ для ЛРС флори України доцільно виконувати відповідно до загальної статті ДФУ 2.8.25 і сучасних вимог до аналітичних методик, роблячи паралельне тестування можливих домішок і оцінюючи можливість виконання паралельного визначення кількісного вмісту компонентів (із хроматограми чи денситограми).

До вимог, що висуваються до сучасних методик ідентифікації методом ВЕТШХ [19], можна віднести: простоту – не містить трудомістких і довготривалих стадій; специфічність – дає змогу однозначно ідентифікувати рослину, відрізнити споріднені види, небажані домішки, виявити фальсифікат; відтворюваність – значення R_F є відтворюваними, умови методики не вносять похибок і не впливають на одержуваний результат; розробку відповідно до принципів зеленої хімії (відсутність токсичних розчинників або обґрунтованість їх застосування; зменшення кількості

використовуваних розчинників); відсутність двозначності висловів і фраз, що може вплинути на кінцевий результат.

Головні етапи розроблення нової методики ідентифікації ВЕТШХ – ідентичні ТШХ, і включають розроблення умов хроматографування – вибір БАР, вибір стаціонарної фази, вибір рухомої фази, оптимізацію дериватизації, вибір режимів детекції [19] і встановлення критеріїв прийнятності. Згідно зі загальною статтею 2.8.25 має бути обрана «критична пара» речовин для проведення тесту на придатність хроматографічної системи і обрані маркери інтенсивності для більш точного опису результатів інтенсивності зон. Приклад критичної пари і маркерів інтенсивності наведено на рис. 2. і рис. 3. Паралельно досліджують валідаційні параметри методики ідентифікації: специфічність, відтворюваність, стабільність.

Рис. 2. Приклад вибору критичної пари для тесту на специфічність і придатність хроматографічної системи (SST) у двох рухомих фазах на флавоноїди і гідроксикоричні кислоти після проявлення реагентом аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти (АЕДК), 366 нм

При розробленні методик ідентифікації мають бути визначені і задокументовані хроматографічні відбитки досліджуваного виду ЛРС. Для тестування мають бути залучені не менше 7 зразків сировини одного виду з різних регіонів України, різних років збору (включаючи точно аутентифіковані і комерційно доступні зразки) чи зразки різних серій ЛРС. Окрім того, під час розроблення методики ідентифікації доцільно визначення хроматографічних відбитків аутентичного зразка, екстрагованого різними розчинниками (вибір розчинників має ґрунтуватися на застосовуваних екстрагентах відповідних ЛРС).

Розроблення випробування на домішки методом ВЕТШХ має проводитися паралельно з розробленням методики ідентифікації у тих самих хроматографічних умовах. Для цього до тестування має бути залучена якомога більша кількість близьких видів ЛРС флори України, інших частин рослини, морфологічно схожої сировини та ін. Електронні знімки хроматограм мають бути задокументовані і збережені належним чином. За необхідності, може бути проведена оптимізація методики ідентифікації ВЕТШХ у методику визначення біоактивності на пластині. Приклад оптимізації методики ідентифікації ТШХ у ВЕТШХ, визначення хроматографічних відбитків можливих домішок і виконання біодетекції на пластині ВЕТШХ наведено на рис. 3.

Рис. 3. Оптимізація методики ідентифікації флавоноїдів і гідроксикоричних кислот (ТШХ у ВЕТШХ) для квіток та листя глоду:

Рухома фаза – етилацетат, метилетилкетон, кислота мурашина безв., вода (5:3:1:1);
A – хроматографічні відбитки флавоноїдів і гідроксикоричних кислот: введення критичної пари і маркерів інтенсивності; тестування фармакопейних видів квіток та листя глоду і можливих домішок – нефармакопейних видів (флори України, Азії, Північної Америки);
B – хроматографічні відбитки речовин з антиоксидантною активністю фармакопейних і нефармакопейних видів;
C – хроматографічні відбитки різних частин глоду: треки 1–3 – квітки та листя глоду; 4–6 – плоди глоду; дослідження впливу різних розчинників: треки 1, 4 – метанол; 2, 5 – абс. етанол; 3, 6 – 70% етанол;
D – оптимізація етапів детектування і дериватизації (можливість виявлення різних груп речовин квіток та листя глоду: флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, проціанідини, тритерпеноїди (треки 1–6) і речовини з антиоксидантною активністю (трек 7); треки 8–10 – плоди глоду). Виявлення: трек 1 – 254 нм без дериватизації; 2 – 366 нм без дериватизації; 3 – 366 нм після оброблення реагентами аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти (АЕДК)/макроголу;
 4, 8 – біле світло після оброблення реагентами АЕДК/Fast Blue Salt B; 5, 9 – біле світло після оброблення реагентами АЕДК/анісовим альдегідом; 6, 10 – 366 нм після оброблення реагентами АЕДК/анісовим альдегідом; 7 – біле світло після оброблення реагентом 2,2-дифеніл 1-пікрилгідразилу

Рис. 4. Застосування рухомих фаз різної полярності для додаткових досліджень інших класів речовин глоду:

A, B – хроматографічні відбитки тритерпенових сапонінів різних зразків фармакопейних видів квіток та листя глоду. Рухома фаза – толуол, етилацетат, кислота мурашина безв. (70:30:1).

Виявлення після оброблення реагентом анісового альдегіду: A – біле світло; B – 366 нм.

C, D – хроматографічні відбитки процанідинів і тритерпенових сапонінів різних частин зразків глоду. Рухома фаза – метилхлорид, етилацетат, кислота мурашина безв. (6:10:2).

Виявлення після оброблення реагентом анісового альдегіду:

C – біле світло; D – 366 нм.

Треки: 1–5 – квітки та листя глоду; 6–13 – плоди глоду.

Дослідження впливу різних розчинників: треки 1, 2, 5, 6, 9–13 – метанол;

3, 7 – абс. етанол; 4, 8 – 70% етанол

Якщо для однозначної аутентифікації зразка ЛРС ідентифікації однієї групи БАР/маркерів не достатньо, належним чином має бути розроблена ще одна (чи дві) методики ідентифікації інших груп БАР у рухомих фазах іншої полярності [15]. Приклад розширеної ідентифікації різних груп БАР наведено на рис. 4. Цей підхід дає змогу швидко і просто одержати всебічну інформацію щодо хімічного складу досліджуваного об'єкту і однозначно ідентифікувати рослину чи виявити фальсифікат/доброякісність сировини.

Інструментальна ВЕТШХ дає змогу здійснювати специфічне кількісне визначення одного чи декількох компонентів (за умови прийнятного розділення) або специфічно визначати суму всіх речовин, що розділилися на пластині, у перерахунку на обраний стандарт. Кількісне визначення може бути виконано шляхом трансформації електронного знімка хроматограми в профіль піків за допомогою системи фото-документування або за допомогою сканера (із денситограми). Приклад оптимізації методики ідентифікації у методику кількісного визначення наведено на рис. 5.

Для кількісного визначення компонента методом ВЕТШХ будується калібрувальна крива з використанням стандартного зразка відомої концентрації. Залежно від завдання методики (кількісне визначення, визначення граничного вмісту) калібрування може бути здійснено з використанням однієї точки (концентрації) стандартного зразка або декількох точок (зазвичай, не менше п'яти концентрацій). Одна точка калібрування може бути використана тільки, якщо метод є добре відомим, був попередньо валідованим, і відомий лінійний діапазон застосування. Підтвердження специфічності і вибір аналітичної довжини хвилі визначається шляхом вивчення спектральних характеристик аналіту за допомогою сканера ВЕТШХ. Наявність можливості нанесення на пластинку ВЕТШХ до 15 зразків дає змогу, у деяких випадках, виконувати на одній пластині розширений аналіз ВЕТШХ (ідентифікацію, домішки, кількісне визначення, біодетекцію).

Рис. 5. Оптимізація методики ідентифікації флавоноїдів і гідроксикоричних кислот ВЕТШХ настойки плодів глуду в методику специфічного кількісного визначення суми флавоноїдів, у перерахунку на гіперозид, після дериватизації з розчином алюмінію хлориду

Висновки

1. Враховуючи виявлені проблемні питання контролю якості рослинних засобів в Україні, запропоновано системний науково-методологічний підхід до оптимізації стандартизації ЛРС і ЛРЗ із застосуванням сучасного аналітичного методу ВЕТШХ, зокрема до оптимізації існуючих і розробки нових методик ідентифікації, а також визначення домішок, розроблення альтернативних методик кількісного визначення і досліджень стабільності.

2. Перевагами системного науково-методологічного підходу до стандартизації ЛРС і ЛРЗ із використанням ВЕТШХ порівняно з існуючими є: підвищення специфічності аналізу, врахування потенційних домішок і наявних ЛРЗ на ринку України, автоматизація аналізу, належне документування і зберігання результатів аналізу за допомогою програмного забезпечення, можливості паралельного аналізу багатьох зразків і отримання розширеної інформації щодо зразка (ідентифікація, домішки, кількісне визначення, біодетекція), оптимізація економічних і трудових витрат.

3. Запропонований підхід може бути використаний для всебічного аналізу ВЕТШХ вітчизняних рослинних засобів для наукових досліджень, попередження фальсифікації, «скрізної» стандартизації від ЛРС до ЛРЗ, проведення фармацевтичної розробки і досліджень стабільності.

Список використаної літератури

1. Frommenwiler D. A., Booker A., Vila R. et al. Comprehensive HPTLC fingerprinting as a tool for a simplified analysis of purity of ginkgo products // J. Ethnopharmacol. – 2019. – V. 243. – P. 112084. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112084>
2. Canigueral S., Frommenwiler D. A., Reich E. et al. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) in the quality control of herbal products / Recent Advances in Pharmaceutical Sciences VIII. – 2018. – P. 119–136. ISBN: 978-81-308-0579-5
3. Frommenwiler D. A., Kim J., Yook C. S. et al. Comprehensive HPTLC Fingerprinting for Quality Control of an Herbal Drug – The Case of Angelica gigas Root // Planta Med. – 2018. – V. 84, N 06/07. – P. 465–474. <https://doi.org/10.1055/a-0575-4425>
4. Frommenwiler D. A., Trefzer D., Schmid M. et al. Comprehensive HPTLC fingerprinting: A novel economic approach to evaluating the quality of Ganoderma lucidum fruiting body // J. Liquid Chromatography & Related Technol. – 2020. – V. 43, N 11–12. – P. 414–423. <https://doi.org/10.1080/10826076.2020.1725560>
5. Frommenwiler D., Sabatini-Samori C., Scherübl R. et al. An alternative and simplified approach to identification and test for minimum content of TCM herbal drugs // Pharmeur. Bio Sci. Notes. – 2021. – P. 1–25.
6. Хохлова К. О., Вишневецька Л. І., Здорик О. А., Ковпак Л. А. Порівняння хроматографічних профілів флавоноїдів і гідроксикоричних кислот деяких видів родини *Lamiaceae*, представлених на фармацевтичному ринку України // Фармац. журн. – 2020. – Т. 75, № 2. – С. 67–78. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.2.20.07>
7. Державна фармакопея України. 2-е вид. Доп. 2. – Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2018. – 336 с.

8. Лікарські рослини: енциклопед. дов. / За ред. А. М. Гродзинського. – К., 1990. – 544 с.
9. Определитель высших растений Украины / Д. Н. Доброкаева, М. И. Котов, Ю. Н. Прокудин и др. – К.: Наук. думка, 1987. – 548 с.
10. Лекарственные растения Украины. Справочник для сборщика и заготовителя / Д. С. Ивашин, З. Ф. Катина, И. З. Рыбачук и др. – К.: Урожай, 1974. – 376 с.
11. Державна фармакопея України 2.0. В 3 т. – Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 3. – 732 с.
12. European Pharmacopoeia 8.0. – Strasbourg: EDQM, 2014. – 3655 p.
13. USP Dietary Supplements Compendium. – 2019. URL: <https://www.usp.org/products/dietary-supplements-compendium>
14. Method collection / HPTLC Association. URL: <https://www.hptlc-association.org/methods/methods.cfm>
15. Eloff J. N., Ntloedibe D. T., Brummelen R. A simplified but effective method for the quality control of medicinal plants by planar chromatography // Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med. – 2011. – N 8. – P. 1–12. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i5S.11>
16. Leong F., Hua X., Wang M. et al. Quality standard of traditional Chinese medicines: comparison between European Pharmacopoeia and Chinese Pharmacopoeia and recent advances // Chin. Med. – 2020. – V. 15, N 76. <https://doi.org/10.1186/s13020-020-00357-3>
17. Котов А. Г. Дослідження з розробки та введення монографій на лікарську рослинну сировину до Державної фармакопеї України // Фармаком. – 2009. – № 1 – С. 5–19.
18. Котова Е. Е., Котов А. Г. Систематизація фармакопейних вимог до методів контролю якості лікарської рослинної сировини. Уніфіковані ТПХ-методи ідентифікації // Фармаком. – 2015. – № 1. – С. 41–47.
19. Reich E., Schibli A. High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. – New-York: Thieme, 2007. – 264 p. <https://doi.org/10.1055/b-0034-65188>
20. Renger B., Vegh, Z., Ferenczi-Fodor K. Validation of thin layer and high performance thin layer chromatographic methods // J. Chromatogr. A. – 2011. – V. 1218. – P. 2712–2721. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.059>
21. Spangenberg B., Poole C. F., Weins Ch. Quantitative Thin-Layer Chromatography. A Practical Survey. – New-York: Springer, 2011. – 388 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-10729-0>

References

1. Frommenwiler D. A., Booker A., Vila R. et al. Comprehensive HPTLC fingerprinting as a tool for a simplified analysis of purity of ginkgo products // J. Ethnopharmacol. – 2019. – V. 243. – P. 112084. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112084>
2. Canigual S., Frommenwiler D. A., Reich E. et al. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) in the quality control of herbal products / Recent Advances in Pharmaceutical Sciences VIII. – 2018. – P. 119–136. ISBN: 978-81-308-0579-5
3. Frommenwiler D. A., Kim J., Yook C. S. et al. Comprehensive HPTLC Fingerprinting for Quality Control of an Herbal Drug – The Case of Angelica gigas Root // Planta Med. – 2018. – V. 84, N 06/07. – P. 465–474. <https://doi.org/10.1055/a-0575-4425>
4. Frommenwiler D. A., Trefzer D., Schmid M. et al. Comprehensive HPTLC fingerprinting: A novel economic approach to evaluating the quality of Ganoderma lucidum fruiting body // J. Liquid Chromatography & Related Technol. – 2020. – V. 43, N 11–12. – P. 414–423. <https://doi.org/10.1080/10826076.2020.1725560>
5. Frommenwiler D., Sabatini-Samori C., Scherübl R. et al. An alternative and simplified approach to identification and test for minimum content of TCM herbal drugs // Pharmeur Bio Sci Notes. – 2021. – P. 1–25.
6. Khokhlova K. O., Vyshnevska L. I., Zdoryk O. A., Kovpak L. A. Porivniannia khromatohrafichnykh profilei flavonoidiv i hidroksykorychnykh kyslot deiakykh vydiv rodyny Lamiaceae, predstavlenykh na farmatsevychnomu rynku Ukrainy // Farmats. zhurn. – 2020. – T. 75, № 2. – S. 67–78. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.2.20.07>
7. Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.2. – Kharkiv: DP «Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv», 2018. – 336 s.
8. Hrodzynskiy A. M. (ed.). Likarski roslyny: entsykloped. dov. – K., 1990. – 544 s.
9. Prokudin, Yu. N., Dobrochaeva, D. N., Zaveruha, B. V. et al. (ed.). Opredelitel vysshih rasteniy Ukrainyi. – K.: Nauk. dumka. 1987. – 548 s.
10. Ivashin, D. S., Katina, Z. F., Ryibachuk, I. Z. et al. Lekarstvennyie rasteniya Ukrainyi. Spravochnik dlya sborschika i zagotovatelya. – K.: Urozhay, 1974. – 376 s.
11. Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0. v 3 t. – Kharkiv: DP «Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv», 2015. – T. 3. – 732 s.
12. European Pharmacopoeia 8.0. – Strasbourg: EDQM, 2014. – 3655 p.
13. USP Dietary Supplements Compendium. – 2019. URL: <https://www.usp.org/products/dietary-supplements-compendium>
14. Method collection / HPTLC Association. URL: <https://www.hptlc-association.org/methods/methods.cfm>
15. Eloff J. N., Ntloedibe D. T., Brummelen R. A simplified but effective method for the quality control of medicinal plants by planar chromatography // Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med. – 2011. – N 8. – P. 1–12. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i5S.11>
16. Leong F., Hua X., Wang M. et al. Quality standard of traditional Chinese medicines: comparison between European Pharmacopoeia and Chinese Pharmacopoeia and recent advances // Chin. Med. – 2020. – V. 15, N 76. <https://doi.org/10.1186/s13020-020-00357-3>

17. Kotov A. H. Doslidzhennia z rozrobky ta vvedennia monohrafii na likarsku roslynnu syrovynu do Derzhavnoi Farmakopei Ukrainy // Farmakom. – 2009. – T. 1. – S. 5–19.
18. Kotov A. H., Kotova E. E. Systematyzatsiia farmakopeinykh vymoh do metodiv kontroliu yakosti likarskoi roslynnoi syrovyny. Unifikovani TShKh-metodyky identyfikatsii // Farmakom. – 2015. – T. 1. – S. 41–47.
19. Reich E., Schibli A. High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. – New-York: Thieme, 2007. – 264 p. <https://doi.org/10.1055/b-0034-65188>
20. Renger B., Vegh, Z., Ferenczi-Fodor K. Validation of thin layer and high performance thin layer chromatographic methods // J. Chromatogr. A. – 2011. – V. 1218. – P. 2712–2721. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.059>
21. Spangenberg B., Poole C. F., Weins Ch. Quantitative Thin-Layer Chromatography. A Practical Survey. – New-York: Springer, 2011. – 388 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-10729-0>

Надійшла до редакції 7 червня 2021 р.
Прийнято до друку 29 червня 2021 р.

К. О. Хохлова (<http://orcid.org/0000-0002-7151-6763>)

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

НАУКОВО-МЕТОДОЛОГІЧНИЙ ПІДХІД ДО СТАНДАРТИЗАЦІЇ ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ І ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИННИХ ЗАСОБІВ ЗІ ЗАСТОСУВАННЯМ МЕТОДУ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Ключові слова: високоефективна тонкошарова хроматографія, лікарська рослинна сировина, ідентифікація, кількісне визначення, домішки, стандартизація

А Н О Т А Ц І Я

Метод високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) широко застосовують для контролю якості лікарської рослинної сировини.

Метою роботи є визначення проблемних питань контролю якості лікарської рослинної сировини в Україні та розроблення системного науково-методологічного підходу до стандартизації лікарської рослинної сировини і рослинних засобів зі застосуванням сучасного аналітичного методу ВЕТШХ, зокрема до оптимізації існуючих і розробки нових методик ідентифікації, визначення домішок, розроблення альтернативних методик кількісного визначення, досліджень стабільності.

У результаті критичної оцінки існуючих підходів до стандартизації лікарської рослинної сировини в Україні було виявлено низку проблемних питань, що включають: наявність обмеженої кількості національних монографій/національних частин монографій на рослинну сировину флори України, не стандартизовану раніше іншими фармакопеями; не врахування видів флори України (нефармакопейних) у монографіях на споріднені види, введені до Державної фармакопеї України; недостатню специфічність комбінацій фізико-хімічних методів застосовуваних для контролю якості; недостатню специфічність, невідтворюваність і трудомісткість методик; необхідність проведення аналізу із застосуванням токсичних розчинників і прекурсорів; використання різних груп біологічно активних речовин і методик для вихідної сировини і рослинного засобу, або для близьких видів лікарської рослинної сировини тощо. Запропонований системний науково-методологічний підхід до стандартизації лікарської рослинної сировини і рослинних засобів за методом ВЕТШХ включає: попередній збір інформації про об'єкт дослідження, маркери/групи біологічно активних речовин, підходи до його стандартизації; теоретичну оцінку існуючих методик контролю якості монографій лікарської рослинної сировини і їх експериментальну апробацію на зразках вітчизняної лікарської рослинної сировини; визначення необхідності оптимізації існуючих методик шляхом паралельної розробки специфічних, відтворюваних і документованих методик ідентифікації, визначення домішок, кількісного визначення і біодетекції (за потреби) методом ВЕТШХ. Підхід ілюструється прикладами.

Запропонований підхід може бути використаний для всебічного аналізу ВЕТШХ вітчизняних рослинних засобів для наукових досліджень, попередження фальсифікації, «скрізної» стандартизації від лікарської рослинної сировини до рослинних засобів, проведення фармацевтичної розробки і досліджень стабільності.

Е. А. Хохлова (<http://orcid.org/0000-0002-7151-6763>)

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

НАУЧНО-МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Ключевые слова: высокоэффективная тонкослойная хроматография, лекарственное растительное сырье, идентификация, количественное определение, примеси, стандартизация

А Н Н О Т А Ц И Я

Метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) широко применяют для контроля качества лекарственного растительного сырья.

Целью работы является определение проблемных вопросов контроля качества лекарственного растительного сырья в Украине и разработка системного научно-методологического подхода к стандартизации лекарственного растительного сырья и растительных средств с применением современного

аналитического метода ВЭТСХ, который включает оптимизацию существующих и разработку новых методик идентификации и определения примесей, а также разработку альтернативных методик количественного определения, изучения стабильности.

В результате критической оценки существующих подходов стандартизации лекарственного растительного сырья в Украине был выявлен ряд проблемных вопросов, таких как: наличие ограниченного количества национальных монографий/национальных частей монографий для растительного сырья флоры Украины, не стандартизованного ранее другими фармакопеями; не учитывание видов флоры Украины (нефармакопейных) в монографиях на близкие виды, введенные в Государственную фармакопею Украины; недостаточную специфичность комбинаций физико-химических методов, применяемых для контроля качества; недостаточную специфичность, невоспроизводимость и трудоемкость методик; необходимость проведения анализа с использованием токсичных растворителей, прекурсоров; использование разных групп биологически активных веществ и методик для исходного сырья и соответствующего препарата или для близких видов. Предложенный системный научно-методологический подход к стандартизации лекарственного растительного сырья и растительных средств методом ВЭТСХ включает: предварительный сбор информации про объект исследования, маркеры/группы биологически активных веществ, подходы к его стандартизации; теоретическую оценку существующих методик контроля качества монографий лекарственного растительного сырья и экспериментальную апробацию с использованием образцов отечественного сырья; определение необходимости оптимизации методик путем параллельной разработки специфичных, воспроизводимых и задокументированных методик идентификации, определения примесей, количественного определения и биодетекции (при необходимости) методом ВЭТСХ для видов растительного сырья флоры Украины. Подход иллюстрируется примерами.

Предложенный подход может быть использован для расширенного анализа ВЭТСХ отечественных растительных средств при проведении научных исследований, для предупреждения фальсификации, для контроля качества и исследований стабильности лекарственного растительного сырья и растительных средств.

K. O. Khokhlova (<http://orcid.org/0000-0002-7151-6763>)

National University of Pharmacy, Kharkiv

SCIENTIFIC-METHODOLOGICAL APPROACH FOR STANDARDIZATION OF HERBAL RAW MATERIALS AND HERBAL PREPARATIONS USING HIGH-PERFORMANCE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY PROCEDURE

Key words: high-performance thin-layer chromatography, herbal raw material, identification, quantification, adulterations, standardization

A B S T R A C T

The high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) is widely used for quality control of herbal raw materials (HRM).

The purpose of this work were to define the problematic issues of quality control of herbal drugs in Ukraine and to develop a systematic scientific and methodological approach for the standardization of HRM and herbal drugs using the modern analytical technique of HPTLC: to optimize the existing and develop new methods of identification and determination of adulterations, and to develop alternative methods of quantitative determination, as well as studying of the stability.

As a result of a critical evaluation of existing approaches for the standardization of HRM and herbal drugs of Ukraine's flora, numerous problematic issues were identified, including the existence of a limited number of national monographs / national parts of monographs on the HRM of the Ukraine's flora, which were not previously standardized by other pharmacopeias; non-consideration of Ukraine's flora species (non-pharmacopoeial) in monographs on closely related species that introduced in the State Pharmacopoeia of Ukraine; lack of specificity of combinations of physical and chemical methods used for quality control; lack of specificity and reproducibility, the labor intensity of methods; necessity of usage of toxic solvents and precursors; use of different groups of markers and methods for the HRM and its finished product or HRM and its closely related species, etc. The proposed systematic scientific and methodological approach includes: a preliminary collection of information about the object of study, markers/groups of bioactive substances, approaches to its standardization; theoretical evaluation of existing techniques of quality control in monographs on HRM and experimental approbation using samples of domestic plants, determination of the need for optimization of existed methods by the parallel development of specific, reproducible and documented methods for identification, adulterations' detection, quantification, and bio-detection (if necessary) by HPTLC method. The approach is illustrated with examples.

The proposed approach can be used for comprehensive HPTLC analysis of domestic HRM and herbal drugs for research, prevention of adulteration, standardization of initial HRM and its finished product, pharmaceutical development, and stability studies.

*Електронна адреса для листування з автором: kateryna_khokhlova@ukr.net
(Хохлова К. О.)*